

上海乳牛霉形体的分离与鉴定

陈嘉棣 黎济申 张赋平 赵洪兴 许日龙 张孙渠*

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所)

(1982年6月7日收稿)

摘 要

在上海地区九个大中型奶牛场中,共采集48个乳样,31个哺乳犊牛鼻拭子作霉形体(*Mycoplasma*)的分离培养。从有临床或隐性乳房炎母牛的乳样中分离到6株霉形体,从1~3月龄的犊牛上呼吸道分离到14株霉形体。经血清学鉴定,这些菌株分别属于牛霉形体(*M. bovis*)和牛鼻霉形体(*M. bovirhinis*)两个种。

引 言

在乳牛业中,乳房炎是直接损害牛只健康、影响其生产性能而导致较大经济损失的一种常见病。就本试验所涉及的奶牛场中,全年因临床型乳房炎所造成的经济损失估计就有十余万元。因此,如何控制乳房炎的发生和发展,在乳牛业生产中,无疑是一项非常重要而迫切的事。

与牛乳房炎有关的微生物有近30种,其中与牛乳房炎有关的霉形体有5种^{[1][2]}。欧洲的几个国家、澳大利亚、新西兰和美国的一些州陆续报道了由霉形体引起的乳房炎^{[2][3][4][5]}。为了解我国的牛乳房炎病与霉形体的关系,进行本工作。

材 料 与 方 法

样品采集:采奶样的试验牛选自上海第二、第四、第五、第六、第八、第十、第十一牧场及第六牧场分场的泌乳母牛,共采集奶样48只。采样时首先清洁乳房,然后采集四个乳区的乳样,混合后作分离培养。

在上海第四、第五、第六、第七、第十、第十一牧场及第六牧场分场选择1~3月龄的哺乳犊牛采鼻拭子作霉形体分离培养。

分离培养:使用Dellinger等^[6]所介绍的改进的Hayflick培养基作原始分离、维持贮藏培养物等用。在以上培养基中加1%琼脂制备固体培养基。

将所采集的样品直接涂布于固体培养基上培养,或在液体培养基中传代后再在固体培养基上进行分离培养。

培养结果观察:孵育2~3天以后,观察固体培养基上所长的菌落。对液体培养基中的菌体,作活体观察,以及Gurr's、Giemsa染色后镜检^{[7][8]}。

检查是否回复细菌型:将所分离到的菌株在不含醋酸铊及青霉素的液体培养基中传

代并检查分离物是否回复到细菌型。

洋地黄皂甙敏感试验：如Stalbeim等^[9]所介绍的那样，制备洋地黄皂甙纸片作洋地黄皂甙敏感试验。

血清学试验：以生长沉淀试验^[10]和圆纸片生长抑制试验，对所分离的菌种作血清学鉴定。

抗血清：抗牛霉形体PG45、抗牛鼻霉形体PG43、抗牛生殖道霉形体PG11、抗产碱霉形体PG51、抗精氨酸霉形体G230、抗霉形体种7组PG50等血清均系日本尾形学教授所赠。

结 果

奶样分离培养的结果列于表 I。

表 1 从牛奶中分离培养的结果

场 别	取 样 牛 号	样品直接接种固体分离结果	先液体培养基传代后上固体分离结果	是否细菌L型	洋地黄皂甙敏感性
第二牧场	77720, 74447, 80047	-	-	-	+
第四牧场	5635, 5115, 5153, 5416 5471, 5825, 5023, 5608	-	-		
第五牧场	1212, 826, 818 1000, 702	-	-		
第六牧场	6096, 6072, 5766 6377, 5644	-	-		
第六牧场3场	36, 0773, 0723, 1360 1819, 0090, 1403	-	-		
第八牧场	1173, 1428 1083, 1278, 1427	-	+	-	+
第十牧场	1486, 865 1412, 1206, 1129, 1057, 1300, 1104, 1410	-	+	-	+
第十一牧场	75176, 77045, 77018 78118, 73102, 73187	-	-		

由表 I 可见，从48个牛奶样品中得到五株分离物。所有乳样直接接种固体培养基均未分离到微生物，而经液体培养基传三代再培养于固体培养基时，从中得到了阳性的结果。

鼻拭子作的分离培养结果列表 II。

从表 II 可见，在所采集的31个犍牛鼻拭子中得到14个分离物，这14个鼻拭大部分直接涂布于固体培养基即能长出菌落，如将鼻拭子先在液体培养基中孵育48小时，则能提高检出率。

在固体培养基上培养72小时，大部分菌落显边缘整齐、有明显中央突起的典型“荷包蛋”状（见图 1）。牛鼻霉形体72小时培养，多数菌落直径较大，达600~700微米（见图 2），中央突起不明显。

表 II 犊牛鼻拭子分离培养结果

场 别	取 样 牛 号	鼻拭子直接 分离的结果	鼻拭子37°C孵 育48小时后再 分离的结果	是否细菌L型	洋地黄皂 甙敏感性
第四牧场	5740, 5732, 5455	-	-		
	5598, 5269, 5385	-	-		
第五牧场	51, 57, 42, 54	+	+	-	+
	50	-	+	-	+
第六牧场	1098, 1099 1079	+	+	-	+
	6401生	-	-		
第七牧场	81088, 81058	+	+	-	+
	81042, 81061	-	+	-	+
	81100	+	+	-	+
第十牧场	61	+		+	-
	64	+		-	+
	67	-			
第十一牧场	无号1, 无号2	-	-		
	101, 12, 97	-	-		
六牧分场	2126, 2125	-	-		
	814生	-	-		

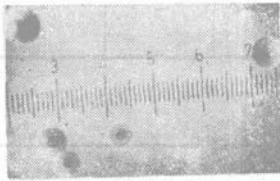


图1. 从牛奶中分离培养小27小时的牛霉形体的菌落照片。可见有明显的中央突起, 典型的“荷包蛋状”。(×23)

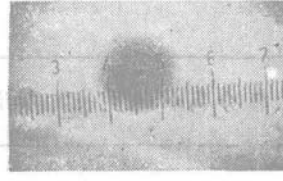


图2. 犊牛鼻腔中分离培养72小时的牛鼻霉形体的菌落照片。(×32)

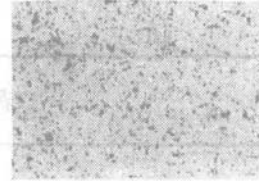


图3. 从80047号母牛奶样中分离到的牛霉形体经Gurr's Giemsa染色后之菌体照片。(×1000)
图1—3 缩小1/2

在相差系统观察沉淀的活菌体时, 可见到球状、短杆状、逗号状、丝状或成丛的微生物, 且各种形状的微生物都可呈现出柔软的弯曲变形运动式翻滚运动。

液体培养物的沉淀涂片经Giemsa染色后, 也可观察到多形态的微生物(见图3), 有点状、杆状、两极状或短杆短丝相连成簇等各种形态, 偶见小环状。

从表 I、II 可以看到, 除了从第十牧场61号犊牛鼻拭子来的分离物回复到细菌型, 对1.5%洋地黄皂甙不敏感外, 其他19株分离物均不回复到细菌型, 并对洋地黄皂甙敏感。

从牛奶中分离到的80047菌株, 第一次用定型菌种抗血清作生长抑制试验时, 在抗牛霉形体PG45及抗牛鼻霉形体PG43抗血清的纸片周围都有长着稀疏菌落的抑制圈, 经移植在抗牛霉形体血清抑制圈内的稀疏菌落, 得到在生长沉淀试验中与抗牛鼻霉形体血清产生沉淀线的80047 L菌株 (*M. bovirhinis*); 移植抗牛鼻霉形体血清抑制圈内的稀疏

表3 各分离物生长沉淀试验结果

样品来源	菌种	抗血清					
		牛霉形体 PG45	牛鼻霉形体 PG43	7组 PG50	牛生殖道霉形体 PG11	产碱霉形体 PG51	精氨酸霉形体 G230
牛 奶	80047SF ₄	+	-	-	-	-	-
	80047LF ₄	-	+	/	/	/	/
	1173F ₃ G ₃ F ₁₃	+	-	-	-	-	-
	865SF ₄	+	-	-	-	-	-
	1428G ₄ F ₁₆	+	-	-	-	-	-
	1486F ₃ G ₃ F ₁₃	+	-	-	-	-	-
鼻 拭 子	54GF ₁₈	-	+	-	-	-	-
	57G ₂ FG ₈ F ₁₇	-	+	-	-	-	-
	50G ₄ FG ₄ F ₁₂	-	+	-	-	-	-
	51GF ₁₈	-	+	-	-	-	-
	42DG ₅ F ₁₅	-	+	-	-	-	-
	81100G ₄ FG ₆ F ₁₂	-	+	-	-	-	-
	81088G ₂ F ₂ G ₃ F ₁₃	-	+	-	-	-	-
	81061G ₄ FG ₉ F ₁₆	-	+	-	-	-	-
	81042G ₄ FG ₉ F ₁₅	-	+	-	-	-	-
	81058G ₃ F ₁₆	-	+	-	-	-	-
	1079G ₄ F ₁₃	-	+	-	-	-	-
	1099G ₄ F ₁₆	-	+	-	-	-	-
	1098G ₄ F ₁₂	-	+	-	-	-	-
	64G ₄ F ₁₆	-	+	-	-	-	-

表4 各分离物的生长抑制试验结果

样品来源	菌株	抗血清					
		7组 PG50	牛鼻霉形体 PG43	牛霉形体 PG45	牛生殖道霉形体 PG11	产碱霉形体 PG51	精氨酸霉形体 G230
牛 奶	1428G ₄ F ₁₅	0	0	> 5 mm	0	0	0
	1173F ₃ G ₃ F ₁₂	0	0	> 5 mm	0	0	0
	865SF ₃	0	0	2.5mm	0	0	0
	80047SF ₃	0	0	> 5 mm	0	0	0
	1486F ₃ G ₃ F ₁₂	0	0	2.2mm	0	0	0
鼻 拭 子	81058G ₂ F ₁₅	0	2 mm*	0	0	0	0
	81042G ₄ FG ₉ F ₁₄	0	4 mm	0	0	0	0
	81100G ₄ FG ₆ F ₁₂	0	2 mm	0	0	0	0
	42dG ₅ F ₁₄	0	5 mm	0	0	0	0
	64G ₄ F ₁₅	0	2.3mm	0	0	0	0
	1099G ₄ F ₁₅	0	1.7mm	0	0	0	0
	81061G ₄ FG ₆ F ₁₂	0	4.25mm	0	0	0	0
	51eF ₁₇	0	3.75mm	0	0	0	0
	54GF ₁₇	0	5 mm	0	0	0	0
	1079G ₃ F ₁₂	0	1.65mm	0	0	0	0
81088G ₂ F ₂ G ₃ F ₁₅	0	3 mm	0	0	0	0	

* 纸片周围抑制圈的平均宽度。

菌落, 得到与抗牛霉形体血清产生沉淀线的80047S菌株 (*M. bovis*)。

各分离物用生长沉淀试验及生长抑制试验鉴定的结果列于表Ⅲ及表Ⅳ。

从表Ⅲ可见, 在生长沉淀试验中, 80047S、1173、865、1428、1486等五个菌株能

与抗牛霉形体PG45抗血清产生沉淀线(图4)。而54、57、50、51、42、81100、81088、81061、80047 L、81042、81058、1079、1099、1098、64各菌株则与抗牛鼻霉形体PG43抗血清产生沉淀线。

如表V所示,在生长抑制试验中,抗牛霉形体PG45抗血清能抑制80047 S、865、1428、1486、1173五个菌株的生长。抗牛鼻霉形体PG43抗血清能抑制81058、81042、81100、42、64、1099、81061、51、54、1079、81088等十一个菌株的生长。

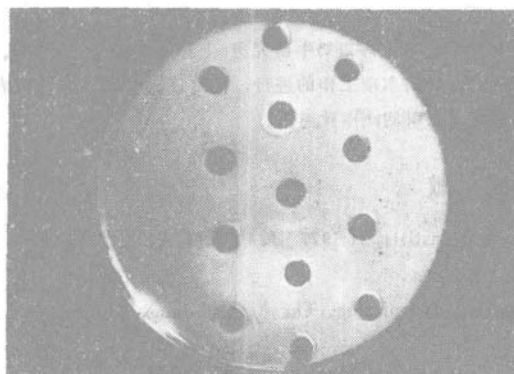


图4.鉴定从牛奶中分离到的霉形体之生长沉淀试验照片。具体添加位置如下:

H C
G A
F D
E I
M B
L J
K

A抗牛霉形体PG45抗血清, B抗牛鼻霉形体PG43抗血清, CJ 8004-S菌株, DI1173菌株, E 865菌株 FM 1428菌株, GL1486菌株, HKPG45菌株。

结论与讨论

鉴于从牛奶及犊牛鼻拭子中所分离到的微生物能在人工培养基中长期传代,菌体为多形态的微生物,菌落为典型的“荷包蛋”状,在不含醋酸铊和青霉素的培养基中不回复到细菌型,对洋地黄皂甙敏感,与霉形体分类委员会所推荐的鉴定程序^[11]相对照,可以认为分离物系霉形体。

根据生长沉淀试验及生长抑制试验的结果,进一步证明所分离到的霉形体中80047S、1173、865、1428、1486五个菌株为牛霉形体(*M. bovis*);而80047L、54、57、50、51、42、81100、81088、81061、81042、81058、1079、1099、1098、64等各菌株为牛鼻霉形体(*M. bovirhinis*)。

根据国外文献报道^[2],牛霉形体不仅能从乳房炎牛所排出之乳中分离到,而且能实验感染泌乳母牛引起乳腺炎,所以认为牛霉形体是引起牛乳房炎的一种病原微生物。从我们分离到牛霉形体的几头母牛的临床情况来看,除80047号母牛在发病后用青、链霉素治疗之后乳汁外观恢复正常而成为带菌者外,1486、865、1173、1428四头母牛在发病后,虽经青霉素、链霉素、新霉素、庆大霉素、红霉素等药物治疗,未能恢复正常。因此,我们认为在这些奶牛场中,不仅有牛霉形体的带菌者,而且可能存在有牛霉形体所引起的乳房炎。

据报道^[2],牛鼻霉形体是一个从牛呼吸道中最常分离到的霉形体种,偶而也可以从乳房炎牛奶、牛生殖道等处分离到,虽然实验感染未能证实其在呼吸道的致病性,但接种乳腺后,对乳腺有轻度的致病性。因此,对一些牛鼻霉形体有较高分离率的牧场来说,值得关注。

有报道认为犊牛关节炎与引起乳房炎的霉形体有关^{[2][12][13]}。我们亦曾经以牛奶

中分离到的霉形体实验感染犊牛,诱发了关节炎^[14]。因此认为上海某些牧场临床发生的,青、链霉素治疗无效的犊牛关节炎可能与霉形体的感染有关,应予注意。

从牛体分离到的霉形体能在改进的Hayflick培养基中长期传代生长良好,但用此种固体培养基从牛奶中作牛霉形体的直接分离培养则效果欠佳,一般都需要经液体培养基增菌后才能分离到。虽然这可能与样品所含的菌体数有关,但也不能排除改进培养基提高分离率的必要性。

致 谢

衷心感谢日本东京大学尾形学教授赠予霉形体定型菌种抗血清。对上海市奶牛研究所、上海第二、四、五、六、七、八、十、十一牧场以及上海市食品公司朱莉贞、龚玲宝等同志协助本项工作的进行,特此致谢。本文请江苏农科院牧医所郑庆端所长、何正礼付所长、上海市牛奶公司沈延成科长审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Report of the Panel of the Colloquium on Bovine Mastitis. (1977) J.A.V.M.A. 170 (10): 1119.
- [2] Gourlay, R.N., and Howard, O. J. (1979) Bovine Mycoplasmas. The Mycoplasmas Volume 11. Human and Animal Mycoplasmas. P.49.
- [3] Jasper, D.E. (1977) Mycoplasma and Mycoplasma Mastitis. J.A.V.M.A 170 (10): 1167.
- [4] Hale, H.H., Helmboldt, C.F., Plastringe, W.N., and Stula, E.F. (1962) Bovine Mastitis Caused by a Mycoplasma species. Cornell Vet. 52 (4): 582.
- [5] Jasper, D.E., Al-Aubaldi, J.M., and Fabricant, J. (1974) Epidemiologic Observations on Mycoplasma Mastitis. Cornell Vet. 64 (3): 407
- [6] Dellinger, J.D., Jasper, D.E., and Ilic, M. (1977) Characterization studies on Mycoplasmas isolated from bovine mastitis and the bovine respiratory tract. Cornell. Vet. 67 (3): 351
- [7] 张孙栗、陈嘉棣 (1980), 猪喘气病病原支原体无细胞培养物的细胞形态观察。上海农业科技, 第1期: 41.
- [8] 上海农科院畜牧所猪喘气病研究组 (1975), 猪喘气病病原支原体的分离培养。微生物学报, 15(4): 302.
- [9] Stalheim, Ole.H.V., Barber, T.L.etal. (1976) Laboratory Diagnosis of Mycoplasmas in food Animals. Proc. 19th Ann. Meet. Am. Asso. Vet. Lab. Diag. P. 411.
- [10] 陈嘉棣、周翠堤、黎济申、陈培龙 (1981), 用生长沉淀试验区别猪呼吸道支原体。上海农业科技, 第4期: 29.
- [11] Razin, S. (1973) The Mycoplasmatales. Handbook of Microbiology. Vol. I. P.105.
- [12] Gourloy, R.N. (1973) Significance of Mycoplasma Infections in Cattle. J.A.V.M.A. 163 (7): 905.
- [13] Jasper, D.E. (1967) Mycoplasmas: Their Role in Bovine Disease J.A.V.M.A. 151 (12): 1650.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BOVINE MYCOPLASMA IN SHANGHAI

Chen Jai-di Li Ji-shen Zhang Fu-ping
Zhao Hong-xing Xu Ri-long Zhang Sun-qu

Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine

Shanghai Academy of Agricultural Sciences

Abstract

Forty-eight milk samples and thirty-one nasal swabs of calves were collected for isolating Mycoplasmal organism from nine dairies in Shanghai. Among these 20 samples, 6 strains of *Mycoplasma* were isolated from milk sample of cows suffering clinical or recessive mastitis and 14 strains of *Mycoplasma* were isolated from the apparently normal upper respiratory tract in the 1-3 month age of calves. The serological identification indicated that these isolates were attributed to *M.bovis* and *M.bovirhinis* respectively.